

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520061152663

UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

基于导电聚合物构建的亲和基材及其性能研究

Preparation and characteristics research on the affinity
matrices fabricated by conductive polymers

曹慧慧

指导教师姓名: 石巍 副教授

专业名称: 生物医学工程

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

本文首次以导电聚合物构建了两形态的亲合吸附基材—聚（N-2-羧乙基吡咯）微米管、聚（吡咯-3-羧酸）-AAO 复合膜，并对它们的形貌、理化性能、吸附及洗脱再生性能进行研究。

（1）聚（N-2-羧乙基吡咯）微米管的制备及性能研究

以聚碳酸酯膜为基膜，采用模板法，通过化学氧化将 N-2-羧乙基吡咯沉积到聚碳酸酯膜孔上，去除聚碳酸酯基膜，得到聚（N-2-羧乙基吡咯）微米管；将 Cu^{2+} 作为亲和配基，通过螯合剂 IDA 与微米管内外表面的 $-\text{COOH}$ 键合，使 Cu^{2+} 固载到微米管的内外壁上，制备得到具有理想形貌的固载 Cu^{2+} 的亲合微米管，并测定了膜上所固载的 Cu^{2+} 的含量为 1.96 mmol/g 微米管。

以血红蛋白（Hb）作为目标蛋白，研究了亲和微米管的吸附性能。结果表明，所制备的亲合微米管对 Hb 展现出良好的吸附特异性，在较低的离子强度、较高的 Hb 初始浓度以及中性的 Hb 溶液（ $\text{pH} = 6.8$ ）条件下有利于获得较高的吸附容量。另外还考察了所制备的亲合微米管对于 Hb 的吸附机理，结果表明实验数据符合 Freundlich 等温吸附机理，且 $R^2 = 0.999$ 。

研究了亲和微米管吸附 Hb 后的洗脱和再生，使用 $\text{pH} = 3.6$ 的醋酸-醋酸钠缓冲液洗脱 Hb 可以达到较大的洗脱率（99.63%）；使用 EDTA 水溶液可将 95% 的 Cu^{2+} 洗脱下来。将洗脱了 Hb 和 Cu^{2+} 的微米管再次固载 Cu^{2+} ，并进行吸附性能的测定，试验结果表明，如此吸附-解吸过程重复 10 次后，Hb 的吸附量仅减少 8%。

（2）聚（吡咯-3-羧酸）-AAO 复合膜的制备及性能研究

以多孔阳极氧化铝（AAO）为模板，用气相沉积聚合法，将吡咯-3-羧酸沉积到 AAO 膜的表面及膜孔内，制得聚（吡咯-3-羧酸）-AAO 复合膜；以赖氨酸为配基，利用亲和膜上的 $-\text{COOH}$ 基团与赖氨酸的 $-\text{NH}_2$ 反应，将赖氨酸固载到亲和膜的表面及孔壁上，并测定了亲和膜上固载的赖氨酸含量（ 5.86 mg/g 膜）。

以胆红素（BR）作为吸附质，系统地研究了所制备的固载赖氨酸的亲合膜的吸附性能，结果表明，经过聚（吡咯-3-羧酸）复合后，极大的降低了 AAO

膜的非特异性吸附；所制备的亲和膜在较高的温度和胆红素初始浓度、较低的离子强度和白蛋白浓度下，对胆红素的吸附量较大。另外还考察了所制备的亲膜对于胆红素的吸附机理，结果表明实验数据符合 Freundlich 等温吸附机理，且 $R^2 = 0.99$ 。

研究了亲和膜吸附胆红素后的洗脱和再生，采用 NaOH 溶液、BSA 溶液对膜进行洗脱，可将膜上 95% 的胆红素洗脱下来，使膜得以再生。

试验证明，采用导电聚合物构建的两种形态的亲吸附基材—聚（N-2-羧乙基吡咯）微米管、聚（吡咯-3-羧酸）-AAO 复合膜均有良好的吸附、解吸和再生性能。

关键词： 基材；亲和微米管；亲和膜；吸附

Abstract

This article fabricated two morphological affinity adsorb matrix by conductive polymers at first time: the poly(N-(2-carboxyethyl)pyrrole) microtubes and the poly(pyrrole-3-COOH)-AAO membrane, and researched on the morphous, physicochemical characteristic, adsorption, elution and regeneration.

(1) Fabrication and characteristics research of the poly(N-(2-carboxyethyl)pyrrole) microtubes:

The poly(N-(2-carboxyethyl)pyrrole) microtubes were fabricated by chemical oxidizing N-(2-carboxyethyl)pyrrole onto porous polycarbonate (PC) track-etch membrane using template method. Cu^{2+} was selected as ligand, chelating reagent IDA reacted with $-\text{COOH}$ on the exterior and interior surface of the microtubes, the Cu^{2+} immobilized affinity microtubes with ideal structure was obtained. The Cu^{2+} content of affinity microtubes was 1.96 mg/g microtubes.

Hemoglobin (Hb) was chosen as the adsorbate, the characteristics and adsorption mechanism of affinity microtubes were studied. The results were that: the prepared affinity microtubes showed good adsorption specificity for Hb; Higher adsorption capacity can be attained at lower ion intensity, higher initial concentration of Hb and neutral Hb solution ($\text{pH} = 6.8$); the mechanisms of Hb adsorption on the affinity microtubes fitted the Freundlich model well, and $R^2 = 0.999$.

The elution and regeneration of affinity microtubes were studied. The Hb adsorbed on the affinity microtubes can be totally eluted by the acetic acid-sodium acetate buffer ($\text{pH} = 3.6$), and the elute rate was 99.63%. Cu^{2+} was eluted by EDTA, and the elute rate was 95%. After adsorption and elution experiment executed 10 cyclic, the adsorption capacity decreased 8%.

(2) Fabrication and characteristics research of the poly(pyrrole-3-carboxylic)-AAO membrane:

The poly(pyrrole-3-COOH)-AAO membrane was fabricated by vapor

deposition polymerization (VDP) onto AAO membrane. Lysine was selected as ligand, through -NH_2 reacted with -COOH on surface of the membrane, the lysine content of affinity membrane was 5.86 mg/g membrane.

Bilirubin (BR) was chosen as the adsorbate, the characteristics and adsorption mechanism of affinity membrane were studied. The results showed: the prepared affinity membrane showed good adsorption specificity for BR; Higher adsorption capacity can be attained at lower ion intensity, higher initial concentration of BR and lower albumin intensity; the mechanisms of BR adsorption on the affinity membrane fitted the Freundlich model well, and $R^2 = 0.99$.

The elution and regeneration of affinity membrane was studied. The BR adsorbed on the affinity membrane can be totally eluted by the NaOH and BSA, and the elute rate was 95%.

The results showed: the different morphological affinity matrix fabricated by conductive polymers: the poly(N-(2-carboxyethyl)pyrrole) microtubes and the poly(pyrrole-3-COOH)-AAO membrane had favourable adsorption, desorption and regeneration function.

Keywords: Matrix; Affinity microtube; Affinity membrane; Adsorption

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目 录.....	I
Content.....	IV
第一章 绪 论	1
1.1 亲和柱色谱技术研究进展	1
1.1.1 亲和柱色谱法基本原理.....	1
1.1.2 亲和柱色谱的基材.....	2
1.1.3 亲和柱色谱的配基及分类介绍.....	4
1.1.4 亲和柱色谱法的应用及展望.....	8
1.2 亲和膜技术研究进展	9
1.2.1 亲和膜分离的基本原理和过程.....	9
1.2.2 亲和膜的制备.....	10
1.2.3 亲和膜技术应用及展望.....	14
1.3 导电聚合物	17
1.4 本课题的提出和研究内容	17
参考文献	20
第二章 聚（N-2-羧乙基吡咯）亲和微米管的制备及性能研究	24
2.1 引言	24
2.2 实验部分	25
2.2.1 材料及仪器.....	25
2.2.2 聚（N-2-羧乙基吡咯）微米管的制备及表征	27
2.2.3 固载Cu ²⁺ 亲和微米管的制备	30
2.2.4 固载Cu ²⁺ 的亲和微米管的吸附试验	32
2.2.5 蛋白的洗脱和亲和微米管的再生.....	37

2.3 结果与讨论	39
2.3.1 N-2-羧乙基吡咯单体结构鉴定	39
2.3.2 聚(N-2-羧乙基吡咯)微米管的制备和表征	41
2.3.3 亲和微米管固载Cu ²⁺ 的含量	42
2.3.4 固载Cu ²⁺ 亲和微米管的吸附性能	43
2.3.5 蛋白洗脱和亲和微米管的再生	46
2.3.6 分离蛋白纯度分析	47
2.4 本章小结	47
参考文献	49
第三章 聚(吡咯-3-羧酸)-AAO复合膜的制备及性能研究	52
3.1 引言	52
3.2 实验部分	53
3.2.1 材料及仪器	53
3.2.2 聚(吡咯-3-羧酸)-AAO复合膜的制备和表征	55
3.2.3 固载赖氨酸的亲和膜的制备	56
3.2.4 固载赖氨酸的亲和膜的吸附试验	58
3.3 结果与讨论	61
3.3.1 聚(吡咯-3-羧酸)-AAO复合膜的制备和表征	61
3.3.2 固载赖氨酸的亲和膜的表征	63
3.3.3 固载赖氨酸的亲和膜的吸附性能	66
3.3.4 膜的洗脱和再生	71
3.4 本章小结	71
参考文献	73
第四章 结论与展望	75
4.1 结论	75
4.2 本文工作创新点	77
4.3 展望	78
硕士期间发表专利及论文	80

致 谢.....	81
----------	----

厦门大学博硕士论文摘要库

Content

Chapter 1 Review	1
1.1 The research progress of affinity column chromatography	1
1.1.1 Principle of affinity column chromatography	1
1.1.2 Affinity column chromatographic matrices	2
1.1.4 Affinity column chromatographic ligand and classification	4
1.1.6 Application and expectation of affinity column chromatography ...	8
1.2 The research progress of Affinity membrane	9
1.2.1 Principle and process of affinity membrane	10
1.2.2 Preparation of affinity membrane	11
1.2.3 Application and expectation of affinity membrane	14
1.3 Conductive polymers	17
1.4 Main focus of this thesis	18
Reference.....	20
 Chapter 2 Fabrication and characteristics research of the	
poly(N-(2-carboxyethyl)pyrrole) microtubes	24
2.1 Introduction.....	24
2.2 Experiment	25
2.2.1 Materials and apparatus	25
2.2.2 Fabrication and characterization of the poly(N-(2-carboxyethyl)	
pyrrole) microtubes	27
2.2.3 Fabrication of the Cu ²⁺ immobilized affinity microtubes	30
2.2.4 Adsorption experiment of the affinity microtubes	32
2.2.5 Elution and regeneration of affinity microtubes	37
2.3 Results and discussion	39
2.3.1 The structure characterization of N-(2-cyanoethyl)pyrrole	39
2.3.2 The prepared condition and characterization of the microtubes ..	41

2.3.3 The content of Cu^{2+} immobilized on the affinity microtubes	42
2.3.4 Adsorption experiment of affinity microtubes	43
2.3.5 Elution and regeneration of affinity microtubes	46
2.3.6 Separate protein purity analysis	47
2.4 Summary.....	47
Reference.....	49
Chapter 3 Fabrication and characteristics research of the poly(pyrrole-3-carboxylic)-AAO membrane.....	52
3.1 Introduction.....	52
3.2 Experiment	53
3.2.1 Materials and apparatus	53
3.2.2 Fabrication and characterization of poly(pyrrole-3-carboxylic)- AAO membrane	55
3.2.3 Fabrication and characterization of the lysine immobilized affinity membrane.....	56
3.2.4 Adsorption experiment of the lysine immobilized affinity membrane.....	58
3.3 Results and discussion	61
3.3.1 Fabrication and characterization of poly(pyrrole-3-carboxylic)- AAO membrane	61
3.3.2 Characterization of the lysine immobilized affinity membrane.....	63
3.3.3 Adsorption experiment of lysine immobilized affinity membrane	66
3.3.4 Elution and regeneration of affinity membrane	71
3.4 Summary.....	71
Reference.....	73
Chapter 4 Conclutions and Future Works	75
4.1 Conclusions.....	75
4.2 Creative points.....	77

4.3 Future Works.....	78
Publications	80
Acknowledgements	81

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪 论

1.1 亲和柱色谱技术研究进展

1.1.1 亲和柱色谱法基本原理

近年来,生物技术的迅速发展,对于多肽、蛋白质、核苷酸等生物分子以及细胞等纯化分离的要求越来越迫切。因为不论自然界存在的还是通过发酵、培养、合成等手段人工制取的上述物质,在初始阶段总是由多种物质组成的混合物,不能直接在医药、食品等行业应用,必须经过分离、纯化,提取出一种或几种真正有用的物质,而将那些无用甚至有害的物质加以去除才能使用。这些生物分子一般都具有生物活性,一旦脱离了它们原来的生理环境或与某些金属或载体相接触,很容易改变其分子构象,并失去其固有的活性。它们的热稳定性也较差,有的需在恒温(如体温)才不变性,有的需在低温(如4℃)才能保持其活性。在用生物技术制取的初产品中,其浓度都较低,因此对它们的浓缩、分离、提取是一个难以解决的复杂课题,是生物学家和化学家所面临的共同任务。对于生物工程下游目标产品的纯化分离,采用传统的方法和手段,如沉淀、结晶、离心、冻干、萃取等都还达不到所要求的纯度,还必须用色谱、膜分离等手段进一步分离纯化。

亲和柱色谱(affinity chromatography, AC)是利用生化物质间特异性相互作用从而实现分离,这种相互作用具有识别功能,即一种物质(配基)能特异性地识别某一个或一类目标产物(配体),因此该技术已经广泛应用于生物分子的分离和纯化,如结合蛋白、酶、抑制剂、抗原、抗体、激素、激素受体、糖蛋白、核酸及多糖类等;也可以用于分离细胞、细胞器、病毒等^[1-2]。亲和作用是范德华力、疏水力、空间和静电等作用力的综合表现,亲和吸附时,配基与配体之间主要遵循以下互补匹配原则:(1)几何形状互补匹配;(2)静电相互作用互补匹配;(3)疏水相互作用互补匹配。几乎所有的生物活性物质与其特异性的互补结合物质之间,都存在着亲和作用,这种亲和作用是基于配基与生物分子之间的生

物学特异性，而不是物理化学性质，因此，采用亲和柱色谱进行生物物质的分离具有选择性强、纯化效率高等优点，其优化效果远远高于其他分离方法，已广泛用于生物工程中许多有经济价值和应用价值的蛋白质产品的纯化。

1.1.2 亲和柱色谱的基材

亲和柱色谱对基材的要求是：（1）表面积大；（2）基材颗粒为均匀的球形，有一定的机械硬度和化学稳定性；（3）非特异性吸附弱；（4）抗生物降解；（5）有一定的粒度；（6）能功能化，可直接或通过间隔臂与配基连接。在实际应用时，还应考虑基材的孔隙率和基材骨架对配基微环境的影响。传统的亲和柱色谱基材填料是从液相色谱发展而来的，如琼脂糖、聚丙烯酰胺、纤维素、硅胶、多孔玻璃、陶瓷等，这些均为微球或无定形填料，大小一般在60~300目之间。其中最常用的是以琼脂糖为代表的多糖类软胶。多糖结构疏松，不易吸附敏感生物大分子，也不使其变性，且pH适用范围比较广，亲和容量高，价格比较便宜。这类基材不足之处是质软，不耐压，在较低的pH范围内易降解，此外，其固有的可压缩性使其在流速方面受限制，因此限制了它在大规模分离纯化中的应用。为了克服这些缺点，人们通过多糖交联方法获得了半刚性凝胶交联琼脂糖，常见的有Sepharose CL 4B、6B等，目前，多糖类凝胶仍是应用最广的亲和柱色谱基材。控制孔径的多孔玻璃是亲和柱色谱中一类独特的基材，它不溶解，几乎不受洗脱液、压力、流速、pH值和离子强度变化的影响；但它非特异性吸附较强，有报道将葡聚糖涂布于玻璃珠上，消除了非特异性吸附作用。另一种应用广泛的基材是硅胶，其刚性结构在流速方面比琼脂糖有很大改善，机械强度高，有很好的流体动力学性质和化学稳定性，不溶于有机溶剂，孔径和形状易人为控制，但由于硅胶的表面有残余电荷使得其非特异性吸附强，且只在低pH值范围内稳定，碱性过大，即使表面覆盖一层疏水聚合物，易被腐蚀。近年来，在硅胶的改性研究方面已见多篇文献报道。Lakhiari^[3]等用表面包敷一层葡聚糖的大孔硅胶作基材，它结合了多糖凝胶的优点和硅胶的高机械强度，将N-乙酰氨酸连接在这种基材上，分离得到高纯度的胰岛素。基材的结合容量与其表面积呈正比。据此发展起来的直径1~3 μm的硅胶和有机聚合物的无孔微粒，表面积大、刚性好、结合容

量高，较好地改善了柱效，有利于提高样品的回收率和保持其生物活性，适合于生物大分子的高分辨分离和快速分析。Lee^[4]等以平均直径1.4 μm 的无孔硅球作基材，分离纯化了人免疫球蛋白IgG。合成的高分子微粒，如聚丙烯酰胺（PAA）、聚乙烯醇（PVA）、聚四氟乙烯（PTFE）等，有良好的化学稳定性，pH适用范围广，与生物大分子有良好的生物相容性，在蛋白质的分离纯化过程中能保持样品的生物活性；尽管耐压性和柱效率不如硅胶，但它们的亲水性减少了对蛋白质的非特异性吸附。一些基材的适宜pH范围见表1-1。

表 1-1 常用基材及其 pH 值适用范围

Table 1-1 usual matrix and the serviceable range of the pH

基材	pH 范围
纤维素	1~14
交联琼脂糖	2~14
葡聚糖	2~14
硅胶	< 8
玻璃	< 8
聚丙烯酰胺	3~10
羟乙基异丁烯酸	2~12
环氧乙烷-丙烯酸聚合物	0~12
苯乙烯-二乙烯苯聚合物	1~13
聚丙烯醇	1~14
N-丙烯酰胺-2-氨基-2-羟甲基-1, 3-丙二醇	1~11
聚四氟乙烯	不受 pH 影响

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库